

· 论 著 ·

缺氧对离体培养的海马神经元兴奋性的影响*

陈 秀[#], 陈莉芬, 吴万福, 胡长林[△]

(重庆医科大学附属第二医院神经内科 400010)

摘要:目的 探讨不同缺氧处理时间对海马神经元兴奋性的影响。方法 原代培养海马神经元(95% N₂/5% CO₂)混合气饱和人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)灌流缺氧,选取灌流 10、15、20、25、30、35、40、45 min 后 8 个时段,采用全细胞记录模式测定神经细胞膜电位;电流钳下阶跃电流(+60 pA~+40 pA, step=10 pA, 时长 200 ms)刺激,测定神经细胞阈强度。对照组神经元灌流(95% O₂/5% CO₂)混合气饱和 ACSF。结果 缺氧处理 15、20 min 后神经细胞膜电位数值升高,较对照组差异有统计学意义($P<0.05$);而缺氧处理 30、35、40、45 min 后神经细胞膜电位数值低于对照组膜电位($P<0.05$)。神经细胞缺氧处理 15、20 min 后,其阈强度高于对照组($P<0.05$);而缺氧处理 30、35、40、45 min 后神经细胞阈强度低于对照组($P<0.05$)。结论 缺氧早期神经细胞膜电位呈现超极化,阈强度增高,兴奋性降低;随缺氧程度加剧,神经细胞膜电位呈现去极化,阈强度减低,兴奋性增高。

关键词:缺氧;神经元;兴奋性;膜电位;阈强度

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1257-03

Alterations of excitability from rat hippocampal neurons induced by various hypoxic duration*

Chen Xiu[#], Chen Lifan, Wu Wanfu, Hu Changlin[△]

(1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore alterations of excitability from hippocampal neurons subjected to hypoxia in various duration.

Methods Hypoxia episodes(10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 min duration) of primary cultured hippocampal neurons were produced by switching from ACSF equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ to ACSF equilibrated with 95% N₂/5% CO₂. Membrane potentials of neurons in the different hypoxia duration were measured by whole-cell recording, and then threshold intensity, that was minimum current intensity inducing action potential in neuron, was tested by step currents(-60 pA~+40 pA, step=10 pA, time=200 ms) in neurons exposed to various hypoxia duration. Neurons in control group were perfused with ACSF equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. **Results** Membrane potential values of hippocampal neurons with exposure to hypoxia for 15, 20 min were higher than those in control group($P<0.05$); and as compared with control group, membrane potential values of hippocampal neurons with exposure to hypoxia for 30, 35, 40, 45 min were decreased($P<0.05$). Threshold intensities of neurons subjected to hypoxia for 15, 20 min were higher than those in control group($P<0.05$), however, threshold intensities of neurons with exposure to hypoxia for 30, 35, 40, 45 min were lower than those in control group($P<0.05$). **Conclusion** Hippocampal neurons take on hyperpolarization of membrane potential, enhancement of threshold intensity, and thereby decrease of excitability in early hypoxic stage. With hypoxic time extension, hippocampal neurons present depolarization of membrane potential, reduction of threshold intensity, and so increase of excitability.

Key words: anoxia; neurons; excitability; membrane potentials; threshold intensity

缺氧是神经元常见的损伤因素。缺氧除使神经元出现能量紊乱外还刺激某些基因的表达,影响某些跨膜离子通道转运而改变神经元的内环境^[1-2],导致神经元兴奋性改变,从而导致痫性发作或神经元损伤。缺氧性脑损伤后痫性发作为一复杂病理过程,与神经细胞兴奋性变化有着密切关联。因此,探讨不同程度缺氧对海马神经细胞兴奋性电生理特性的影响,有助于对缺氧性脑损伤后痫性发作机制更为全面深入的认识,目前,类似研究相对较少。作者利用膜片钳记录技术对此进行了研究。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物和主要试剂仪器 1 日龄 SD 大鼠,雌雄不限,由第三军医大学医学实验动物中心提供。95% O₂/5%

CO₂, 95% N₂/5% CO₂ 混合气购自重庆朝阳气体有限公司; HEPES、EGTA、K₂ATP、葡萄糖酸钾、联咪二苯吡啶(DAPI)、马血清(HoS)、胰蛋白酶、B27、多聚赖氨酸为 Sigma 公司产品; DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)购于 Hyclone 公司;小鼠抗 NF-200 单克隆抗体、CY3 标记羊抗小鼠 IgG 购于武汉博士德公司。膜片钳放大器(Axopatch200B, 美国 Axon 公司),电极拉制仪(Narishige PC-10, 日本 Olympus),玻璃微电极购于南京六合泉教学实验器材厂。

1.1.2 主要配制试剂 种植培养液:为含 FBS 和 HOS 各 10% 的 DMEM/F12 培养液;无血清培养液:为含 B27 的 DMEM/F12 培养液,其浓度为 2%;人工脑脊液(Artificial cerebrospinal fluid, ACSF)离子成分及浓度(mmol/L): NaCl 126, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26、

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2008BB5236);四川省教育厅资助项目(08ZC036)。△ 通讯作者, Tel: (023)

63693088; E-mail: hhcc12000@yahoo. com. cn。

现在泸州医学院附属医院神经内科工作(邮编 646000)。

葡萄糖 10; 电极内液成分及浓度 (mmol/L): 葡萄糖酸钾 145、 $MgCl_2$ 2、HEPES 5、EGTA 0.5、K2ATP 5。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元无血清原代培养

参考文献[3]将培养方法进行适当改进, 步骤如下: 分离乳鼠海马, 将其剪碎, 0.25% 胰蛋白酶消化 20 min 左右, 血清终止消化, 制成细胞悬液, 700 r/min 离心 5 min, 留上清液, 1 000 r/min 再离心 5 min, 弃上清, 加种植培养液重悬细胞, 差速贴壁 25~30 min; 收集细胞悬液; 将细胞悬液滴加在多聚赖氨酸包被过的盖玻片上, 置于 37 °C CO_2 培养箱内, 24 h 后更换为无血清培养液, 隔 3 d 换液 1 次, 每次半量更换培养液, 培养至第 8~14 d 的细胞爬片用 NF-200, DAPI 免疫荧光鉴定神经元, 膜片钳实验前用经氧饱和的 ACSF 替换无血清培养液。

1.2.2 大鼠海马神经元电生理记录

1.2.2.1 细胞缺氧处理方式^[4]

将(95% O_2 / 5% CO_2)混合气饱和的 ACSF 换成经(95% N_2 / 5% CO_2)混合气饱和 ACSF 进行灌流缺氧。

1.2.2.2 膜片钳记录

(1) 记录电极的制备: 玻璃微电极采用软质中性有芯玻璃管(直径 1.4 mm, 长 10 cm), 应用电极拉制器用一步法拉制而成。拉制好的电极尖端直径约 1 μm , 灌入电极内液后阻抗为 5~10 M Ω 。金属电极为氯化银电极, 参考电极为铜板镀银电极, 固定在实验记录槽上。(2) 细胞封接: 采用全细胞记录方法^[5], 将载有培养海马神经元的爬片移入灌流槽, 并持续灌流(95% O_2 / 5% CO_2)或(95% N_2 / 5% CO_2)混合气饱和的 ACSF, 调节灌流流速约 2 mL/min。灌流槽置于显微镜载物台上, 选择表面光滑、胞体呈三角或锥体形, 具有 3 个或 3 个以上突起、折光性强的典型锥体细胞作为研究对象进行膜片钳实验。利用特定测试方波判断细胞封接状态。当电极尖端接触细胞表面时, 记录得到的测试方波回因封接阻抗增大而产生相应变化。此时再给予短暂负压吸引, 电极与胞膜之间电阻会迅速增大至 $1 \times 10^9 \Omega$ 水平以上, 膜与电极之间形成在机械和电学上都十分稳固的紧密封接。此时电极与细胞膜形成了贴附式膜片, 在此基础上再给予负压吸破电极尖端的细胞膜, 使细胞内液与电极内液相通, 形成全细胞膜片, 这时的记录方式为全细胞记录。选择贴附式电阻达 $10 \times 10^9 \Omega$ 以上, 全细胞模式达 1×10^9 以上细胞进行记录。应用 Clampex 采样程序, 测定缺氧处理 10、15、20、25、30、35、40、45 min 后神经细胞的膜电位。然后电流钳下通过记录电极给以一系列超极化到去极化跃阶电流刺激, 测定不同缺氧处理时间的神经细胞($n=25$)阈强度, 即以诱发神经细胞产生动作电位的最低电流强度。对照组除不予低氧处理。进行缺氧数据记录时, 每批次细胞只进行一次缺氧, 因为反复缺氧后, 细胞不能很快恢复到缺氧前状态, 并且缺氧可能造成某些不可逆损伤。(3) 信号记录: 膜片钳放大器采集的电流或电压信号, 经 digidata 1200 转换器接口进入计算机, 通过膜片钳专用软件 pClamp6 程序采样录入, 采样频率为 10 kHz, 滤波频率为 1~5 kHz。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理。电生理记录结果在 Clampfit8.1 (Axon instruments, USA) 回放分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用 one-way ANOVA 分析和 q 检验。

2 结果

2.1 无血清原代培养海马神经元形态及鉴定

倒置相差显微镜下观察, 刚种植的细胞呈均匀单个、圆形、折光性好。24 h 后细胞几乎完全贴壁, 部分细胞已长出突起。3 d 后胞体变

大, 细胞形态多数呈梭形、锥形、三角形或不规则形, 双极或多极突起增多, 随培养时间延长, 胞体呈三角形或锥体形且丰满, 轮廓清晰, 立体感强, 细胞周围光晕明显, 表面光洁, 突起间进一步形成丰富的神经网络联系, 见封 2 图 1。培养 8 d 神经细胞经 NF-200、DAPI 免疫荧光显示, 胞浆及突起发红色荧光, 胞核发蓝光, 见封 3 图 2。

2.2 神经细胞膜电位和阈强度测定

神经细胞膜电位和阈强度是评价细胞兴奋性的重要参数, 直观反映神经细胞兴奋性。培养的海马神经细胞经不同缺氧处理时间后, 其膜电位结果显示: 缺氧处理 15、20 min 后神经细胞膜电位数值升高, 较对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而缺氧处理 30、35、40、45 min 后神经细胞膜电位数值低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 3。阈强度结果显示: 缺氧处理 15、20 min 后阈强度高于对照组 ($P < 0.05$); 而缺氧处理 30、35、40、45 min 后神经细胞阈强度低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 4, 这一结果与缺氧处理后神经细胞膜电位变化是相吻合的。

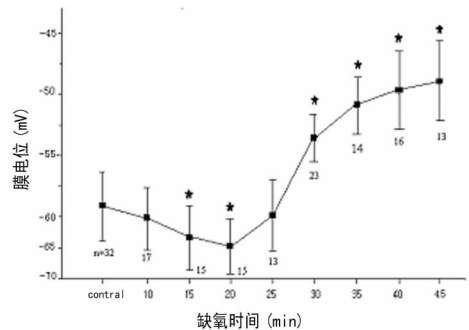
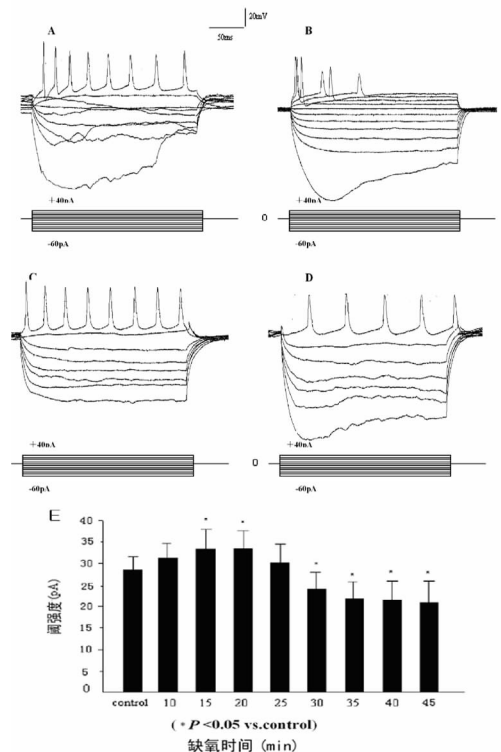


图 3 不同缺氧处理时间的神经细胞膜电位变化



A: 缺氧处理 15 min; B: 缺氧处理 20 min; C: 缺氧处理 30 min; D: 缺氧处理 35 min; E: 不同缺氧处理时间神经元的阈强度

图 4 不同缺氧处理时间与神经细胞的阈强度关系

3 讨论

海马是中枢神经系统中对缺氧最敏感的部位之一, 对大鼠

海马神经元离体研究发现,短时间完全缺氧可以造成海马功能不可逆损伤;长时间缺氧则可以造成神经元形态上损伤甚至死亡。缺氧性脑损伤时细胞外兴奋性氨基酸增高,将激活 N-甲基-D 天门冬氨酸(NMDA)受体及非 NMDA 受体门控离子通道导致细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增高,引起细胞内钙超载^[6]。此外,脑缺氧时,由于 ATP 合成减少致 Na^+ K^+ 泵转运障碍,细胞膜两侧离子梯度无法维持,出现胞内 Na^+ 和胞外 K^+ 增高,膜电位减小,使细胞易发生去极化。而膜去极化促使钙通道开放,也致胞内游离钙浓度增加。胞内游离钙浓度增加可能会激活或者灭活细胞膜上某些电压依赖性离子通道,离子通道变化就可能改变细胞兴奋性,进而有致病性发作的可能。

通常用神经细胞膜电位水平和阈强度来评价神经细胞的兴奋性。研究发现,大鼠海马神经元无论是急性缺氧还是慢性缺氧都会导致兴奋性升高^[4],但 Arabadzise 等^[7]认为慢性缺氧后海马神经元兴奋性降低。还有研究认为,缺氧早期超极化是缺氧诱导的有利于神经元的重要代偿机制,主要由钙激活钾通道(Kca 通道)与 ATP 敏感性钾通道(KATP 通道)所介导,其中前者参与形成膜静息电位和调节峰电位发放频率与神经元兴奋过程。单通道记录显示,缺氧早期(20 min 内)海马神经元 Kca 通道开放概率明显增高,以后则减低。说明缺氧早期 Kca 通道被激活,缺氧后期 Kca 通道明显失活。本实验结果显示缺氧 25 min 内神经细胞膜电位值呈现超极化,而以缺氧 20 min 时最明显,超过 25 min 后呈现去极化;结果还显示在前 4 个观察时点阈强度增高,之后降低。此结果提示,缺氧早期神经细胞膜出现超极化,阈强度高,兴奋性下降,随缺氧作用时间延长神经细胞出现去极化,阈强度下降,兴奋性增加。缺氧早期超极化使细胞兴奋性降低,降低了缺氧神经细胞易去极化,使细胞自发性电活动减少,能量消耗降低,并限制了 Ca^{2+} 内流和钙库的释放,减少谷氨酸和其他兴奋性神经递质的释放,有利于神经元存活。但随缺氧时间延长,大量神经递质释放,某些递质通过 G 蛋白偶联受体活化,激活 cAMP 依赖的蛋白激酶 PKA,使 K^+ 通道蛋白磷酸化,通道失活,外向电流明显降低。此外,缺氧时间延长, Na^+ 通道激活产生的内向电流可能增加。有证据表明在缺氧或氰化物抑制氧化代谢情况下, CA_1 区神经元 Na^+ 电流会持续增强^[8]。反复缺氧所致的钠电流增强会导致多种效应,如动作电位的超射值和发放频率增加,动作电位时程延长等^[9]。这些因素使细胞呈现去极化。因而,缺氧诱导的超极化代偿作用是有限的,随缺氧时间延长,膜电位势必呈现去极化。本实验结果显示了这一趋势。

细胞膜去极化导致膜电位降低,缩小了细胞膜电位与阈电位之间的电位差,使细胞的兴奋性增加。海马脑片缺氧诱导后出现兴奋性增高,可致海马神经网络形成癫痫前状态,与离子型谷氨酸受体和 L 型钙通道有关^[10-11]。缺氧损伤后神经细胞兴奋性增高为一种机体适应性改变,也是形成痫性放电重要因素之一^[12]。缺氧损伤对神经元的迁移、分化、突触形成产生重要作用^[13-14]。此外,脑兴奋性增加与神经元可塑性密切相关^[15],而神经元可塑性改变为痫性发作机制之一。

综上所述,缺氧早期神经细胞膜电位出现超极化,阈强度增高,兴奋性降低,对细胞有重要的代偿保护作用。随缺氧时间延长,神经细胞膜电位出现去极化,阈强度减低,兴奋性增高。可否认为细胞缺氧到一定程度,即可能在某一时段内缺氧细胞处于去极化状态,兴奋性增高,就可能为形成缺氧后痫性发作的电生理机制之一。这一设想与临床所见,即过重或稍轻的缺氧性脑病发生痫性发作的概率相对较少,而达到某种程度

的缺氧性脑病患者继发性发作相对偏多,有一定的相似之处。

参考文献:

- [1] Sheldon D, Claire B, Church J. Reduced contribution from Na^+/H^+ exchange to acid extrusion during anoxia in adult rat hippocampal CA1 neurons[J]. *J Neurochem*, 2004, 88(3):594-603.
- [2] 裴丽香,张一娜,张震环,等. 15-脱氧前列腺 T_2 在大鼠缺氧性神经细胞损伤中的作用[J]. *重庆医学*, 2010, 39(14):1829-1831.
- [3] 张明,郭艺,蒋莉,等. 无血清原代培养大鼠海马神经元的形态及膜电位[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1):131-134.
- [4] Xia Y, Fung MLO, Reilly JP, et al. Increased neuronal excitability after long-term O_2 deprivation is mediated mainly by sodium channels[J]. *Mol Brain Res*, 2000, 76(2):211-219.
- [5] 刘振伟. 实用膜片钳技术[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2006:90-91.
- [6] Kulik A, Brockhaus J, Pedarzani P, et al. Chemical anoxia activates ATP-sensitive and blocks Ca^{2+} -dependent K^+ channels in rats dorsal vagal neurons in situ[J]. *Neuroscience*, 2002, 110(5):541-554.
- [7] Arabadzise D, Ylinen A, Enri Z. Increased inter-spike intervals and fast after hyperpolarization of action potentials in rat hippocampal pyramidal cells accompanied with altered calbindin immunoreactivity 10-12 months after global forebrain ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 331(1):103-106.
- [8] Hammarstroma KM, Gage PW. Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus[J]. *J Physiol*, 2000, 529(1):107-118.
- [9] Gu XQ, Haddad GG. Decreased neuronal excitability in hippocampal neurons of mice exposed to cyclic hypoxia[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(6):1245-1250.
- [10] Godukhin O, Savin A, Kalemenev S, et al. Neuronal hyperexcitability induced by repeated brief episodes of hypoxia in rat hippocampal slices; involvement of ionotropic glutamate receptors and L-type Ca^{2+} channels[J]. *Neuropharmacology*, 2002, 42(5):459-466.
- [11] Levin S, Godukhin O. Developmental changes in hyperexcitability of CA1 pyramidal neurons induced by repeated brief episodes of hypoxia in the rat hippocampal slices[J]. *Neurosci Letters*, 2005, 377(1):20-24.
- [12] Kim DS, Kwak SE, Kim JE, et al. Bilateral enhancement of excitation via up-regulation of vesicular glutamate transporter subtype 1, not subtype 2, immunoreactivity in the unilateral hypoxic epilepsy model[J]. *Brain Res*, 2005, 1055:122-130.
- [13] Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signaling in epilepsies[J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(2):108-115.

细胞技术检测细胞周期及凋亡结果显示,ZD6474 使细胞阻滞于 G₂/G₁ 期,而 5-FU 使细胞阻滞于 S 期。联合用药组中的 G₂/M 期比例明显降低,细胞主要阻滞于 G₀/G₁ 和 S 期,细胞凋亡率明显强于两药单用。有研究表明,ZD6474 能阻断 c-Kit 和它的下游效应子 Akt 和 ERK 从而促进细胞凋亡^[13-15]。而 5-FU 联合 ERK 抑制剂则能通过下调 bcl-2 和上调 caspase-9 来协同抑制黑色素瘤细胞 B16 的增殖及促进其凋亡^[16]。由此推测,抑制 ERK 可能是两药联合产生协同作用的机制之一。

总之,随着分子靶向治疗研究的深入,生物化疗(biochemotherapy)这一全新的肿瘤治疗模式越来越受到人们的关注,ZD6474 单药治疗甲状腺癌、非小细胞肺癌已取得了肯定疗效^[17-18]。本实验通过联用 ZD6474 和 5-FU 的体外实验证明其对肝癌的抗肿瘤作用,探讨了不同联合治疗方案的疗效,开阔了思路,为临床上肝癌生物化疗的治疗模式提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907-1917.
- [2] 王星刚, 刘刚. 原发性肝癌的综合治疗方法探讨[J]. *基层医学论坛*, 2007(15): 695-696.
- [3] Morabito A, Piccirillo M C, Falasconi F, et al. Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions[J]. *Oncologist*, 2009, 14(4): 378-390.
- [4] Giannelli G, Azzariti A, Sgarra C, et al. ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(4): 479-485.
- [5] Rougier P, Mitry E, Barbare J, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC): an update[J]. *Semin Oncol*, 2007, 34 Suppl 1: S12-20.
- [6] 伍福胜. 羟基喜树碱联合甲酰四氢叶酸钙、氟尿嘧啶治疗晚期消化系统肿瘤临床观察[J]. *安徽医药*, 2006(6): 421.
- [7] Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71(1): 537-592.
- [8] Litman T, Druley T E, Stein WD, et al. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(7): 931-959.
- [9] Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1)[J]. *Pflugers Arch*, 2007, 453(5): 621-641.
- [10] Zheng LS, Wang F, Li YH, et al. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5172.
- [11] Correale P, Marra M, Remondo C, et al. Cytotoxic drugs up-regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in colon cancer cells and enhance their susceptibility to EGFR-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9): 1703-1711.
- [12] Wu X, Deng Y, Wang G, et al. Combining siRNAs at Two Different Sites in the EGFR to Suppress its Expression, Induce Apoptosis, and Enhance 5-Fluorouracil Sensitivity of Colon Cancer Cells[J]. *J Surg Res*, 2007, 138(1): 56-63.
- [13] Yang Y, Ikezoe T, Nishioka C, et al. ZD6474 induces growth arrest and apoptosis of GIST-T1 cells, which is enhanced by concomitant use of sunitinib[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(12): 1404-1409.
- [14] Sarkar S, Mazumdar A, Dash R, et al. ZD6474 enhances paclitaxel antiproliferative and apoptotic effects in breast carcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 22(2): 375-384.
- [15] Yang S, Wu J, Zuo Y, et al. ZD6474, a Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitor, Potentiates the Anti-Tumor and Anti-Metastasis Effects of Radiation for Human Nasopharyngeal Carcinoma[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(6): 611-622.
- [16] Yoon H, Min J K, Lee J W, et al. Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011(3): 333-337.
- [17] Herbst R S, Sun Y, Eberhardt W E, et al. Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(7): 619-626.
- [18] Romagnoli S, Moretti S, Voce P, et al. Targeted molecular therapies in thyroid carcinoma[J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009, 53(9): 1061-1073.

(收稿日期: 2011-01-10 修回日期: 2011-03-05)

(上接第 1259 页)

- [14] Zhu L, Lovinger D, Depire E. Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride[J]. *J Neurophysiol*, 2005, 93(3): 1557-1568.
- [15] Witte OW, Freund HJ. Neuronal dysfunction, epilepsy,

and post lesional brain plasticity[J]. *Adv Neurol*, 1999, 81(1): 25-36.

(收稿日期: 2010-04-11 修回日期: 2010-10-11)